第3卷第4期　　　　动 物 学 研 究　　　　Vol. 3, No. 4
1982年11月　　　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　　　Nov., 1982

灵长类淋巴细胞亚群的研究

I. 外周血和淋巴组织的SRBC、SMRBC和ZYC玫瑰花结形成细胞的测定

黄昆龙　戴　伟　宋宝云　邹如金

（中国科学院昆明动物研究所）

内容提要　用经过氨乙基异硫脲（AET）或神经氨酸酶（VCN）处理过的绵羊红细胞（SRBC），酵母多糖—补体复合物（ZYC）和红面猴红细胞（SMRBC）作为标记，测定了健康恒河猴、熊猴、豚尾猴、红面猴和树鼩的外周血以及恒河猴淋巴样组织的淋巴细胞亚群，在这五种动物中，E_{AET}玫瑰花结形成细胞的百分比依次为78.1±6.4，77.7±4.2，76.0±6.4，82和24.9±7.2。ZYC形成细胞的百分比依次为11.4±4.2，9.0±3.8，12.8±2.2，15和15.7±7.4。恒河猴胸腺，脾脏和淋巴结的E_{AET}形成细胞的百分比分别为95.2±2.9，28.8±10.3，44.8±6.2。与人类不同，SMRBC不是恒河猴B淋巴细胞的标记。此外，还与其他作者的结果进行了比较。

淋巴细胞是最重要的免疫细胞。灵长类动物外周血和淋巴样组织内淋巴细胞的分离及其亚群的鉴定是灵长类免疫生物学研究的基本技术和基础资料。关于某些非人灵长类淋巴细胞膜表面的绵羊红细胞（SRBC）和补体（EAC）受体的测定，前人已有部分报导（Taylor, D. W. et al., 1980; Johansen, K. S. et al., 1974; Ganguly, N. K. el al., 1977; Steele, R. W. et al., 1977; Terrell, T. G. et al., 1977）。此外，1975年Pellegrino等发现红面猴红细胞可以同人的B淋巴细胞形成玫瑰花结（Pellegrino, M. A. et al., 1975）。酵母多糖补体复合物（ZYC）是一种简便的测定B细胞的标记（官宜彬等，1980）。

本文1982年2月2日收到。

本文引用的缩写：AET 氨乙基异硫脲；ANAE α—醋酸萘酯酶；E未经处理的绵羊红细胞；EAC 绵羊红细胞—抗体—补体复合物；E_{AET} AET 处理过的绵羊红细胞；E_{VCN} 神经氨酸酶处理过的绵羊红细胞；F—M 蔗聚糖—泛影钠配制的淋巴细胞分离液；SMRBC 红面猴红细胞；PBS 磷酸盐缓冲溶液；SRBC 绵羊红细胞；ZYC 酵母多糖—酵母—补体复合物。

本文报导用蔗聚糖—泛影钠作为淋巴细胞分离液，分离数种灵长类外周血淋巴细胞，并以不同方法处理过的绵羊红细胞（SRBC），红面猴红细胞（SMRBC），酵母多糖—酵母—补体复合物等作为淋巴细胞表面受体的标记，测定了国产5种灵长类动物的淋巴细胞亚群，发现猕猴属动物之间的T、B细胞亚群的比例相近，同人类的结果十分相似。

材料和方法

1.动物

被检动物正常，它们是恒河猴（*Macaca mulatta*）（♂12，♀11），豚尾猴（*M. nemestrina*）（♂2，♀1），熊猴（*M. assamensis*）（♂4），红面猴（*M. speciosa*）（♂1）和树鼩（*Tupaia belangeri*）（♂4，♀5）。

2.外周血淋巴细胞的分离

除树鼩心脏采血外，其余动物自小隐静脉取血1—2 ml，正常人自肘正中静脉采血2 ml，肝素抗凝（约20—50I.u./ml）。全血白细胞计数和分类。锥形刻度玻璃离心管按Hunt所介绍的方法，以5%（V/V）二甲基二氯硅烷氯仿溶液硅化。采血后约1小时之内进行淋巴细胞分离。淋巴细胞分离液系按Kaplan介绍的方法配制。蔗聚糖(Ficoll 400)为Pharmacia Fine Chemicals产品。泛影钠为解放军196医院产品。新鲜血以3倍体积的PBS（pH7.2）稀释，充分混匀后，层加于分离液（d＝1.077）上，3 ml分离液上可层加4—8 ml稀释血。室温下1200 g离心20分钟，小心地吸取分离液界面之上的乳白色单个核细胞层，以PBS洗3次（200 g室温离心5分钟）。然后以199培养基（日本日水制药株式会社产品）洗1次，再以199培养基加至原全血量，白细胞计数，使浓度调至2×10^6/ml左右。取少量样品以细胞离心机（Shandon）离心，90 g 5分钟，供得率和纯度检查用。

3.单个核细胞的细胞化学检查

按宋宝云等的方法进行非特异性酯酶染色，大单核细胞质内有大小一致，分布均匀的特有红色斑点，淋巴细胞的检查标准如另文**。

4.细胞存活率的测定

先后以溴乙锭和吖啶橙染色，荧光显微镜下镜检，死亡细胞为红色，活细胞为绿色（Ford, W. L., 1978）。

5.淋巴样组织的细胞悬液制备*

动物杀死后立即取胸腺，腹股沟淋巴结和脾脏置冰水浴的Dullbecco's溶液内，去除包膜和脂肪后剪碎，以玻璃匀浆器匀浆，取细胞悬液以199培养基洗3次，并进行白细胞计数，调节其浓度至2×10^6/ml（Hunt, S. V., 1978）。

6.绵羊红细胞（SRBC）的制备

（1）普通绵羊红细胞（E） 以Alsever's溶液抗凝，0.9%盐水或PBS（pH7.2）

---

*材料取自医科院昆明医学生物所，特此致谢。

**宋宝云等，1982。

洗3次，最后以Alsever's溶液稀释后保存于4°C。

（2）AET处理的绵羊红细胞（E_{AET}）　按Kaplan（1976）介绍的方法处理。AET系按Doherty等法（1957）由本实验室合成，处理过的SRBC可置4°C保存一周。

（3）神经氨酸酶处理的绵羊红细胞（E_{VCN}）　按Galili等（1974）的方法进行。神经氨酸酶系BDH产品。

7.红面猴红细胞（SMRBC）　处理方法同普通绵羊红细胞。

8.酵母多糖—补体复合物（ZYC）的制备

按官宜彬等的方法（官宜彬等，1980）略加改进。补体源于小鼠血清，ZYC浓度为4—5×10^8/ml，置4°C保存可用1周。

9.玫瑰花结形成

（1）红细胞玫瑰花结形成　各种红细胞悬液的浓度均调节至2×10^8/ml。小牛血清系本实验室自新生雄性奶牛制备。取0.4ml淋巴细胞悬液，加入0.2ml热灭活过的小牛血清和0.4ml红细胞悬液，轻轻混匀，200g离心5分钟，置4°C冰箱1—2小时，然后加入1%戊二醛1滴于细胞悬液内，轻轻混匀，室温下静置20分钟。将细胞悬液轻轻混匀后，取1滴细胞悬液加入到9滴PBS溶液内，混匀后加2—3滴至细胞离心机离心杯内，90g离心5分钟。

（2）ZYC玫瑰花结形成　1份淋巴细胞悬液加入1份ZYC悬液，混匀后37°C保温5分钟，200g离心5分钟。室温或4°C冰箱静置1小时。然后，在1ml悬液内加入1%戊二醛1滴，混匀，静置20分钟，再按红细胞玫瑰花结形成的方法细胞离心。

（3）双标记玫瑰花结形成　将小牛血清，红细胞和ZYC按上述比例先后加入到同1份淋巴细胞悬液内，轻轻混匀，200g离心5分钟，置4°C1—2小时。戊二醛固定和细胞离心的方法同上。

（4）染色　将上述载玻片经空气干燥后，以1:20稀释的Giemsa染液染色5—10分钟。染色时在镜下监测着色的程度。

（5）计数　（a）红细胞形成的玫瑰花结　以紧密接触3个以上的红细胞的淋巴细胞为玫瑰花结形成细胞。此时，往往见到红细胞呈气球状或锥形排列在淋巴细胞周围。（b）ZYC玫瑰花结　淋巴细胞被5个以上ZYC紧紧地包围。计数200个以上的淋巴细胞。

结　果

1.外周血淋巴细胞的分离

猕猴属四种动物的淋巴细胞分离率为50%左右，树鼩的分离率更低。猕猴淋巴细胞悬液的纯度为93—99%，其余3—5%为粒细胞，不到1%为大单核细胞（表1）。混杂的红细胞很少。

以非特异性酯酶染色检查了6只恒河猴的全血淋巴细胞和分离液分离后的淋巴细胞ANAE活性的变化。除4号动物的ANAE　阳性细胞于分离后明显降低外，其余动物无明显变化（表2）。

表1 数种灵长类外周血淋巴细胞的分离率和纯度

Table 1 The Yield and Purity of Peripheral Blood Lymphocyte in Some Primates

种 类 species	动物数 No of Animals	分离率[a] Yields	淋巴细胞[b] Lymphocyte	粒细胞 Granulocyte	大单核细胞 Monocyte	红细胞 Erythrocyte
恒河猴 *Macaca mulatta*	13	53.2±10.8	93.5±6.0	5.20±5.0	0.73±0.95	很少 very rare
红面猴 *M. speciosa*	1	60.1	99.3	0.7	0	很少 very rare
熊猴 *M. assamensis*	4	47.0± 7.9	95.8±2.0	3.62±2.0	0.65±0.2	很少 very rare
豚尾猴 *M. nemestrina*	3	50.5±26.5	95.5±1.9	3.8 ±1.9	0.6 ±0.2	很少 very rare
树鼩 Tupaia belangeri	9	38.8±21.7	50.5±28.2	40.9±29.4	6.5 ±8.7	很少 very rare

a 淋巴细胞分离率＝(淋巴细胞悬液内白细胞浓度×淋巴细胞百分比)÷(全血白细胞浓度×淋巴细胞百分比)×100%

b 未将红细胞数计入.

表2 分离前后外周血淋巴细胞ANAE活性的变化

Table 2 The Changes of ANAE Activity in Peripheral Blood Lymphocyte after Separation

动物号 No. of Animals	全血涂片 *Blood Smear*				分离的淋巴细胞 *Separated Lymphocyte*			
	ANAE++	ANAE+	ANAE-	monocyte	ANAE++	ANAE+	ANAE-	monocyte
66	44	40	15	1	45.5	35	19	1.5
90	68	16	15.5	0.5	69.1	20.6	10.3	0
02	50	37.4	12.1	0.5	52	28.0	18.0	2.0
4	73.2	19.8	6.5	0.5	61.6	26.1	10.0	2.3
196	51.4	30.8	16.6	1.2	54.0	31.5	13.5	1
1	47.5	35.4	15.0	2.1	54.5	30.2	15.3	0
M±SD	55.7 ±10.9	29.9 ± 9	13.5 ±3.4	1 ±0.6	56 ±7.7	29 ±4.5	17.4 ±7.2	1.1 ±0.9
配对t验测 Paired t test	P>0.5							

ANAE++ 细胞内有1—3块浓染的红色斑块（斑块型）

ANAE+ 细胞内有分散的小颗粒状红色微粒（微粒型）

ANAE- 未着色

大单核细胞 细胞内有大小一致的粒状红色斑块均匀分布

2.淋巴细胞的存活率

分离后的外周血淋巴细胞存活率在99%以上。淋巴组织内细胞的存活率平均在95%以上。

3.外周血玫瑰花结形成细胞

恒河猴外周血淋巴细胞中形成E，E_{AET}，E_{VCN}，ZYC和SMRBC玫瑰花结的细胞数的平均值分别为52.1%，76.1%，75.5%，11.4%和10.2%，绝对数平均值分别为每立方毫米3555，5158，4830，749和727。具有E_{AET}+ZYC双标记和SMRBC+ZYC双标记的淋巴细胞平均值分别为1.0%和0.7%。后者表明，与人不同，恒河猴SMRBC玫瑰花结形成细胞并不是B淋巴细胞。

其它猕猴属动物，如豚尾猴、熊猴和红面猴的E_{AET}玫瑰花结形成细胞的百分比同恒河猴相近，分别为76±6.4%，77.7±4.2%和82%（表3）。

树鼩外周血E_{AET}和ZYC玫瑰花结形成细胞的均值分别为24.9%和15.7%（表3）。

4.淋巴组织内E_{AET}和ZYC形成细胞。

恒河猴和树鼩的某些淋巴样组织内E_{AET}和ZYC玫瑰花结形成细胞的比例如表4。恒河猴胸腺细胞中，除死亡者5%左右外，都能形成E_{AET}玫瑰花结。换言之，E_{AET}玫瑰花结形成细胞确为T淋巴细胞。T细胞和B细胞的均值，在脾脏中分别为28.8%和7%，在淋巴结中分别为44.8%和4.1%。

讨　论

用F—M分离液分离外周血淋巴细胞时、由于操作上及动物种属和个体间的差异，不同学者获得不同的分离率和纯度。本文的淋巴细胞得率和纯度偏低，粒细胞的比例偏高，但大单核细胞的比例却很低（Terrell, T. G. et al., 1977）。淋巴细胞的纯度达93—99%。以非特异性酯酶染色证明我们的得率虽低，但未发生淋巴细胞的选择性丧失，这与Hayry等以人外周血所做的结果一致（Hayry, P. et al., 1980）。

我们以不同方法处理的绵羊红细胞测定了猕猴属数种动物外周血玫瑰花结形成细胞的比例，其结果同人类的（80—85%）相近（Gupta, S. et al., 1980），同其它作者的相比，结果高得多，而且四种动物的比例十分相近（表5）（Taylor, D. W. et al., 1980）。恒河猴以外的三种动物的E_{AET}玫瑰花结形成细胞是不是T细胞，尚待对胸腺进行相应的研究。

当以ZYC作为标记来测定外周血B细胞时，猕猴属的比例均值为9—15%，同人类的比例（10—15%）亦很接近（Gupta, S. et al., 1980），这同Taylor等和Ganguly等以EAC作为标记获得的结果差别较大（表5）。其原因尚不明。

当用SMRBC和ZYC进行双标记时，发现双标记的恒河猴外周血淋巴细胞不到1%，提示恒河猴的SMRBC玫瑰花结同人类的不同，并不是B淋巴细胞（Pellegrino, M. A. et al., 1975）。

树鼩是一种价廉的小型动物，外周血、胸腺和脾脏内E_{AET}玫瑰花结形成细胞的比例相近，这种亚群的类型尚不明，待进一步研究。

表3　数种灵长类外周血淋巴细胞形成不同玫瑰花结的百分比和浓度

Table 3 The percentages and Concentrations of Various Rosette Formation Cells in Peripheral Blood Lymphocytes of Some Primates

种类			SMRBC										SMRBC+ZYC			
	E		E_{AET}		E_{VCN}		ZYC		E_{AET}+ZYC		SMRBC		SMRBC+ZYC		ZYC[c]	
species	%	conc.	%	conc.	%	conc.	%	conc.	%	conc.	%	conc.	%	conc.	%	conc.
恒河猴 *Macaca mulatta*	52.2 ±8.7 (3)[a]	3655 ±453	78.1 ±6.4 (23)	5458 ±218	75.6 ±2.8 (4)	4830 ±1670	11.4 ±4.2 (23)	749 ±456	1.0 ±0.9 (22)	97 ±121	10.2 ±3.2 (5)	727 ±357	0.7 ±0.8 (5)	39.8 ±49.3	11.6 ±5.3 (5)	744 ±295
豚尾猴 *Macaca nemestrina*	49 (1)	2964	76.0 ±6.4 (3)	5540 ±2505	—[b]	—	12.8 ±2.2 (3)	880 ±290	1.0 ±0.8 (3)	168 ±160	—	—	—	—	—	—
熊猴 *Macaca assamensis*	61 (2)	6450	77.7 ±4.2 (4)	6670 ±1787	—	—	9.0 ±3.8 (4)	706 ±180	—	—	—	—	—	—	—	—
红面猴 *Macaca speciosa*	—	—	82 (1)	6546	—	—	15 (1)	1432	—	—	—	—	—	—	—	—
树鼩 *Tupaia belangeri*	—	—	24.9 ±7.2 (8)	294 ±185	22.1	108	15.7 ±7.4 (7)	170 ±93	—	—	—	—	—	—	—	—

a.括号内为动物数　b.未做　c.与SMRBC进行双标记时的计数

表 4 恒河猴和树鼩淋巴样组织内E_{AET}和ZYC玫瑰花结形成细胞的百分比

Table 4 The Percentages of E_{AET} and ZYC Rosette Formation Cell in Lymphoid Tissues of *M. mulatta* and *Tupaia belangeri*

种类 species	胸腺 *Thymus* E_{AET}	ZYC	E_{AET}+ZYC	脾脏 *Speen* E_{AET}	ZYC	E_{AET}+ZYC	淋巴结 *Lymph node* E_{AET}	ZYC	E_{AET}+ZYC
恒河猴 *Macaca mulatta*	95.2 ±2.9 (9)[a]	—[b]	—	28.8 ±10.3 (7)	7 ±3.5 (3)	0.33 ±0.23 (3)	44.8 ±6.2 (6)	4.1 ±2.0 (3)	0 (3)
树鼩 *Tupaia belangeri*	38.5 (2)	1.25	0	28.5 (2)	7.3 (2)	0	—	—	—

表 5 不同作者获得的猕猴属四种动物的外周血T和B细胞的比例(%)

Table 5 The Percentages of Peripheral T and B Lymphocytes in 4 Species of Macaques Obtained from Different Authors

作者 Author	本文 Present (1982)			Taylor et al. (1980)	Terrel et al. (1977)	Ganguly et al. (1977)
标记 Marker	E	E_{AET}	E_{VCN}	E_{VCN}	E	E
恒河猴 *M. mulatta*	52 (3)[a]	76.1 (23)	75.5 (4)	63 (20)	63.5 (37)	57.7 (30)
熊猴 *M. assamensis*		77.7 (4)				
豚尾猴 *M. nemestrina*		76.0 (3)		23 (1)		
红面猴 *M. speciosa*		82 (1)		19 (1)		
人 Man		82 (1)				60.0 (17)
标记 Marker		ZYC		EAC	EAC	EAC
恒河猴 *M. mulatta*		11.4 (23)		24	14.9 (20)	22.8 (30)
熊猴 *M. assamensis*		9.0 (4)				
豚尾猴 *M. nemestrina*		12.8 (3)		26 (1)		
红面猴 *M. speciosa*		15 (1)		30 (1)		
人 Man		13 (1)		30 (6)		27.1 (17)

a 括号内为动物数

参 考 文 献

盲宜彬、余世荣 1980 介绍一种测定B淋巴细胞的简易方法。中华血液学杂志 1(4):243—244.

Doherty, D. G. et al. 1957 Synthesis of Aminoalkylisothiuronium Salts and Their Conversion To *Mercaptoalkyguanidines* and Thiazolines. *J. Amer. Chem. Soc.* 97:5667—5571.

Ford, W. L. 1978 The Preparation and Labelling of Lymphocytes. in Handbook of Experimental Immunology, ed. by Weir. Third Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. p23. 10.

Galili. U. et al. 1974 The Formation of Stable Rosettes after Neuraminidase Treatment of Either Human Peripheral Blood Lymphocytes or Sheep Red Blood Cells. *J. Immunol.* 112(5):1628—1634.

Ganguly, N. K. et al. 1977 T and B Cell Populations in the Peripheral Blood of Rhesus Monkeys. Int. Archs. Allergy Appl. *Immun.* 53:290—292.

Gupta, S. et al. 1980 General Orientation of Human Lymphocyte Subpopulations In Clinics. Immunobiology. Vol. 4 p 1—31, Ed. by Bach, F. H. and Good, R. A. Academic Press, New York.

Hayry, P. et al. 1977 Lack of Subclass Selection During Density Purification of Human Lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 28:341—346.

Hunt, S. V. 1978 Separation of Lymphocytes Subpopulations. in Handbook of Experimental Immunology. Ed. by Weiner, D. M. Blackwell Scientific Publication, Oxford, Third edition. p 24. 4.

Johansen, K. S. et al. 1974 T Cell Rosette Formation in Primates, pigs and Guinea Pigs. The Influence of *Immunosuppresive Agents*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 54:86—93.

Kaplan. M. E. et al. 1976 Detection of Human T Lymphocytes by Rosette Formation with AET-Treated Sheep Red Cells. In vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity. Ed. by Bloom, B. R. and David, J. R. Academic Press, New York. p83—88.

Pellegrino, M. A. et al. 1975 Rosette Formation of Human Lymphoid Cells with Monkey Red Blood Cells. *J. Immunol.* 115(4):1065—1071.

Steele, R. W. et al. 1977 E and EAC Rosettes *in Man and Nonhuman Primates and the Effect of* Thymosin in vitro. *J. Med. Primatol.* 6:163—171.

Taylor, D. W. et al. 1980 A Comparative Study of Rosette Formation in 12 Species of Nonhuman Primates. *J. Med. Primatol.* 9:763—82.

Terrell, T. G. et al. 1977 Immunologic Surface Markers on Nonhuman Primate Lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.* 38:503—517.

STUDIES ON LYMPHOCYTE SUBPOULATIONS IN PRIMATES

I. The Determination of SRBC, SMRBC and ZYC Rosette Formation Cell in Peripheral Blood and Lymphoid Tissues

Ben Kunlong Dai Wei Song Baoyun Zhou Rujin

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The lymphocyte subpopulations in peripheral blood of *Macaca mulatta, M. assamensis, M. nemestrina, M. speciosa and Tupaia belangeri* and in lymphoid tissues of *M. mulatta* were determined with markers, such as AET or neuraminidase treated sheep red blood cell (E_{AET} or E_{VCN}), zymosan-yeast-complement complex (ZYC) and stump-tailed monkey (*M. speciosa*) red blood cell (SMRBC). The main results of peripheral blood lymphocytes were seen in table 3.

The percentages of E_{AET} RFC in thymus, spleen and lymph node of *M. mulatta* were 95.2 ± 2.9, 28.8 ± 10.3 and 44.8 ± 6.2, respectively. The double marking with ZYC and SMRBC showed that SMRBC rosette formation cells of *M. mulatta* were not B cells. Finally, the results were compared with those from other authors (see table 5).